

Respon Pertumbuhan dan Produksi Alkaloid pada Kalus Berakar *Datura metel* L. terhadap Peningkatan Mikronutrien dari Medium MS

Wahyu Handayani*, Yulita Nurchayati*, Nintya Setiari*

**Lab. Biologi Struktur dan Fungsi Tumbuhan Jurusan Biologi FSM Universitas Diponegoro*

ABSTRACT

Alkaloid from Solaneous plant has several drug's potents such as antibacterial, even as halusinogenic. This alkaloid from *Datura metel* is sintesized in root and accumulated in shoot. One of methods to the alkaloid production is by roots induction from leaves-derived callus/ rooted callus. Alkaloid production can be improved by modifying of micronutrients in MS (Murashige&Skoog) medium. The aim of this research is to study effect of increment of micronutrients concentration toward growth and total alkaloid on rooted callus. The culture was established from callus in MS without growth regulator with level of micronutrients. Growth culture was representated by fresh and dry weight, whereas total alkaloid content was analyzed by titrimetric method. Data were analyzed descriptively. The result showed that increasing of micronutrients concentration till 2,5-fold on MS medium inhibited growth of rooted callus. However, this condition couldn't trigger the production of alkaloid compounds on culture.

Keywords : Datura metel L., micronutrients, rooted callus, total alkaloids

ABSTRAK

Senyawa alkaloid dari tanaman Solanaceae memiliki potensi obat antara lain sebagai antibakteri bahkan memberi efek halusinasi. Alkaloid pada kecubung, *Datura metel* disintesis pada organ akar dan diakumulasi pada bagian pucuk. Salah satu metoda untuk produksi senyawa alkaloid tersebut adalah dengan menginduksi perakaran dari kalus yang berasal dari daun (induksi kalus berakar). Produksi alkaloid dapat ditingkatkan dengan memodifikasi komponen mikronutrien dari medium dasar MS (Murashige&Skoog). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh peningkatan konsentrasi mikronutrien terhadap pertumbuhan dan kandungan alkaloid total dari kalus berakar. Kultur diperoleh dari induksi kalus dalam medium MS tanpa zat tumbuh dengan perlakuan konsentrasi mikronutrien. Pertumbuhan kultur ditentukan dari berat segar dan berat kering, sedangkan kandungan alkaloid total dianalisis dengan metoda titrasi. Data dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi mikronutrien hingga 2,5 kali dari medium MS menghambat pertumbuhan kalus berakar. Namun demikian, kondisi ini tampak tidak mampu memacu produksi senyawa alkaloid dari kultur.

Kata kunci: Datura metel L., mikronutrien, kalus berakar, alkaloid total.

PENDAHULUAN

Kecubung (*Datura metel* L.) kaya akan senyawa alkaloid dari kelompok tropan (Alexander *et al.*, 2007). Alkaloid yang berasal dari kecubung telah banyak digunakan dalam dunia kesehatan, namun untuk mendapatkan alkaloid perlu mengeksplorasi tanaman yang dibatasi oleh masa dormansi yang panjang dan perkecambahannya yang sulit (Ajungla *et al.*, 2009). Salah satu metode yang digunakan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan teknik *in vitro*.

Teknik *in vitro* sudah banyak dilakukan untuk memproduksi metabolit sekunder, misalnya alkaloid. Kultur yang telah banyak digunakan untuk memproduksi alkaloid adalah dengan kultur kalus, suspensi sel, kultur akar baik transforman maupun non-transforman, juga kalus yang diinduksi membentuk perakaran/ kalus berakar (*rooted callus*). Kultur akar dari tumbuhan *Datura* mampu menghasilkan alkaloid yang lebih tinggi dibandingkan kultur kalus dan suspensi sel, karena senyawa alkaloid disintesis pada akar (Palazon *et al.*, 2008). Kalus yang diinduksi membentuk perakaran/ kalus berakar (*rooted callus*) pada *D. metel* L. belum banyak dilakukan.

Kandungan alkaloid dalam kultur dapat ditingkatkan melalui optimasi medium (Husin *et al.*, 2002), yang dilakukan dengan memodifikasi komponen

medium kultur. Salah satu modifikasi medium yang dilakukan adalah dengan mengubah konsentrasi mikronutrien dalam medium MS (Murashige & Skoog). Mikronutrien merupakan hara yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit dan esensial bagi pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. Konsentrasi mikronutrien yang berbeda dapat berpengaruh terhadap proses metabolisme kultur. Kondisi tersebut dapat diamati pada peningkatan konsentrasi aluminium (Al) pada 60 ppm menyebabkan penurunan pertumbuhan pada kalus (Roy & Mandall, 2005), penambahan $AlCl_3$ dalam medium dapat meningkatkan kadar alkaloid hiosiamin dan skopolamin pada kultur akar *D. metel* L. (Ajungla *et al.*, 2009). Penelitian ini akan mengkaji peningkatan konsentrasi mikronutrien dalam medium MS untuk mengetahui pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan produksi senyawa alkaloid pada kalus berakar.

METODOLOGI

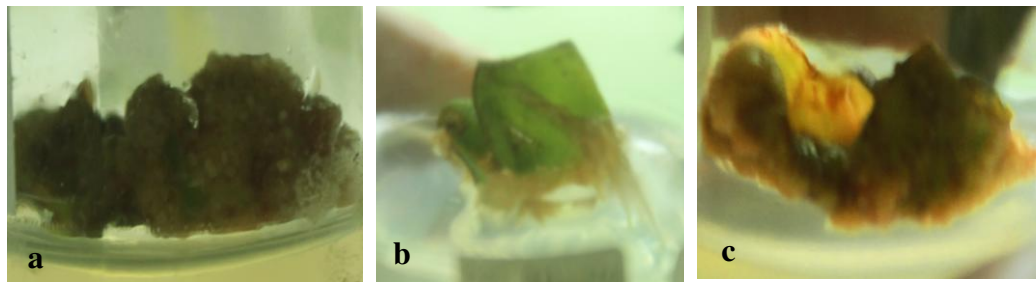
Eksplan yang digunakan potongan daun kecubung, baik dengan ibu tulang daun maupun tanpa ibu tulang daun, yang ditanam dalam medium MS padat secara aseptik. Induksi kalus berakar dilakukan pada medium MS dengan NAA 2,5 ppm. Kultur diinkubasi pada suhu kamar dan di bawah pencahayaan lampu 20 watt. Subkultur dilakukan sekali setelah umur 15

hari. Kalus berakar yang berumur 30 hari kemudian dipindah ke dalam medium perlakuan konsentrasi mikronutrien tanpa penambahan NAA. Perlakuan yang diberikan meliputi 3 macam konsentrasi yaitu mikronutrien standar (C_0), konsentrasi 2 kali standar (C_1), dan konsentrasi 2,5 kali standar (C_2). Kultur pada medium perlakuan dipelihara dengan satu kali subkultur setelah 15 hari, dan dipelihara hingga kultur berumur 30 hari.

Respon pertumbuhan diamati dari penambahan berat basah dan berat kering kalus berakar. Kandungan alkaloid dalam kalus berakar ditentukan dengan analisis kualitatif dan analisis kuantitatif. Analisis kualitatif dilakukan dengan menggunakan pereaksi Bourchardat (Kusyati, 2011), sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan metode titrimetri (Cahyono, 2011, komunikasi pribadi).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eksplan daun yang ditanam pada medium MS dengan NAA 2,5 ppm memiliki respon tumbuh yang berbeda antara daun dengan ibu tulang daun maupun tanpa ibu tulang daun. Eksplan tanpa ibu tulang daun membentuk kalus terlebih dahulu diikuti dengan munculnya akar, sedangkan eksplan dengan ibu tulang daun membentuk akar terlebih dahulu diikuti pembentukan kalus (Gambar 1). Hal ini seperti yang diungkapkan oleh Dhaliwal *et al.* (2004 dalam Robbiani *et al.*, 2010) bahwa pada eksplan daun, akar akan tumbuh dari barisan sel parenkim yang dekat dengan pembuluh vaskuler, hal ini menyebabkan eksplan dengan ibu tulang daun dapat membentuk akar terlebih dahulu.



Gambar 1. Respon pelengkungan eksplan daun dalam medium MS dan pertumbuhan eksplan pada medium MS B

Keterangan :
a. Kalus yang terbentuk
b. Eksplan yang mengalami pelengkungan dan tumbuh akar
c. Eksplan yang mengalami pelengkungan dan tumbuh kalus

Pertumbuhan kalus berakar diukur dari peningkatan berat basah dan berat

kering. Berat basah merupakan berat tanaman yang dipengaruhi oleh kandungan

air dalam jaringan, unsur hara, dan hasil metabolisme. Penambahan berat basah kalus berakar dipengaruhi oleh akar yang

terbentuk dan kandungan air yang diserap dari medium ke dalam sel-sel kalus, yang ditunjukkan Tabel 1.

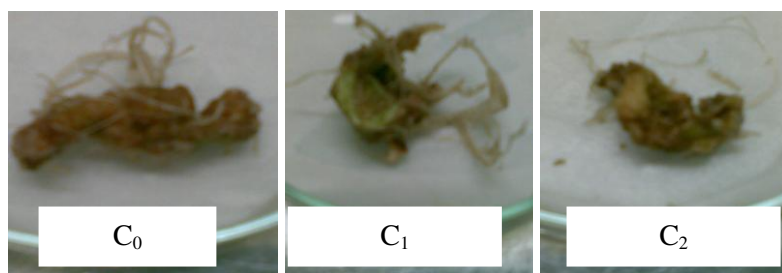
Tabel 1. Penambahan berat basah kalus berakar kecubung pada medium MS tanpa NAA dengan perlakuan konsentrasi mikronutrien

Perlakuan konsentrasi mikronutrien	Penambahan berat basah (g)
C ₀	0,85
C ₁	0,67
C ₂	0,44

Akar yang terbentuk pada kalus mengalami pemanjangan yang dipengaruhi oleh konsentrasi mikronutrien dalam medium MS tanpa NAA. Pemanjangan akar ini berkaitan dengan fungsi akar sebagai organ penyerap air dan mineral. Akar yang tumbuh dari kalus berakar perlakuan C₂ lebih sedikit, lebih pendek, dan lebih kurus dibandingkan dengan akar pada perlakuan C₀ dan C₁ (Gambar 2). Hal ini berkaitan dengan konsentrasi mikronutrien yang tinggi dalam medium, yang menyebabkan kondisi hipertonis bagi sel kalus. Kondisi medium yang hipertonis akan menghambat penyerapan mikronutrien dan memicu pengerutan sel karena air dalam sel akan tertarik keluar. Gambar 2 juga

memperlihatkan bahwa perlakuan C₀ menghasilkan pertumbuhan kalus berakar yang lebih baik dibandingkan perlakuan C₁ dan C₂. Hal ini didukung adanya mikronutrien dalam konsentrasi standar sehingga memberikan kondisi isotonis bagi kultur.

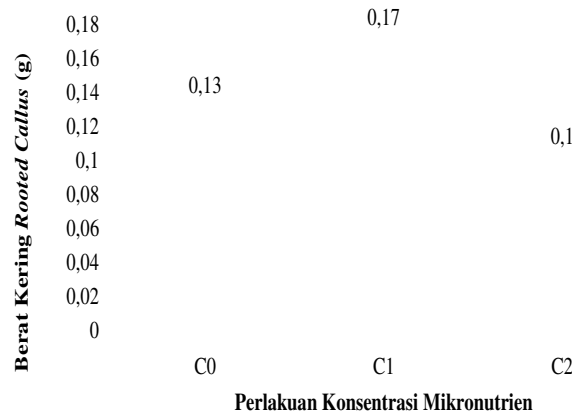
Akar yang memanjang pada semua perlakuan konsentrasi mikronutrien dapat disebabkan oleh keberadaan auksi endogen dalam kalus. Auksin endogen akan memicu pembentukan etilen, dan secara bersamaan akan memicu pembentukan dan pemanjangan akar adventif. Ivanchenko *et al.* (2008), menyatakan bahwa etilen dapat memicu transport auksin secara akropetal dan basipetal pada akar.



Gambar 2. Kalus berakar kecubung yang tumbuh pada medium MS dengan perlakuan konsentrasi mikronutrien dan tanpa penambahan NAA.

Pertumbuhan kultur juga diukur dari berat kering kalus berakar. Berat kering merupakan berat tanaman yang hanya berisi hasil metabolisme setelah kandungan airnya

dihilangkan melalui pengeringan. Produksi tanaman lebih akurat dinyatakan dengan berat kering, karena berat kering tidak dipengaruhi oleh kandungan air.



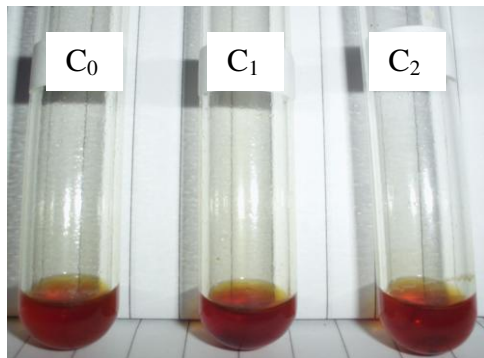
Gambar 3. Histogram berat kering kalus berakar kecubung pada medium MS tanpa NAA dengan perlakuan konsentrasi mikronutrien

Gambar 3 menunjukkan bahwa berat kering kalus pada perlakuan C₁ lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan C₀ dan C₂. Hal ini disebabkan karena akar adventif yang terbentuk pada perlakuan C₁ lebih tebal dan lebih banyak memiliki bulu-bulu akar daripada perlakuan lainnya. Akar C₁ tersebut terbentuk dari ibu tulang daun, sehingga ukurannya lebih tebal dibandingkan akar yang tumbuh dari kalus. Akar adventif lebih tebal karena akar adventif terbentuk dari kambium.

Hasil analisis kualitatif kandungan alkaloid total pada kalus berakar menggunakan pereaksi Bouchardat tidak menghasilkan adanya endapan berwarna putih (Gambar 4), yang menunjukkan bahwa pada kalus berakar tidak terdeteksi adanya senyawa alkaloid.

Alkaloid yang tidak terdeteksi pada kalus berakar kecubung dikarenakan mikronutrien tidak dapat berperan sebagai elisitor eksternal yang akan menginduksi elisitor internal seperti jasmonat, asam salisilat, sistemin, dan signal endogen lain seperti *reactive oxygen species* (ROS) (Mittler *et al.*, 2004; Devoto and Turner, 2005). Sinyal transduksi yang diinduksi oleh elisitor eksternal ini nantinya akan memicu produksi senyawa pertahanan melalui stimulasi secara langsung terhadap jalur metabolisme atau dengan mengaktifkan ekspresi gen yang berperan untuk pertahanan terlebih dahulu. Desender *et al.* (2007) menyatakan elisitor yang berbeda dapat menginduksi pola pertahanan yang berbeda. Hal ini terkait dengan regulasi gen yang berperan penting dalam

merespon stres dan sintesis fitokimia (Kidd *et al.*, 2006).



Gambar 4. Hasil uji kualitatif kandungan alkaloid total dengan pereaksi Bourchardat yang menunjukkan tidak adanya endapan putih (negatif alkaloid)

Alkaloid tidak terdeteksi pada analisis kualitatif meski kalus dengan akar berada dalam kondisi hipertonis, diduga karena kalus dengan akar memiliki senyawa pertahanan lain selain alkaloid. Senyawa pertahanan yang dihasilkan oleh kalus dengan akar bisa berupa senyawa fenol yang merespon terhadap pelukaan (Aryati *et al.*, 2005). Alkaloid yang tidak terdeteksi juga dapat terjadi karena umur fisiologis kultur belum matang untuk dilakukan pemanenan. Umur fisiologis sangat berpengaruh karena semakin lama umur kultur, proses adaptasi dari kultur sudah sangat baik, sehingga kultur akan merespon dengan baik terhadap perlakuan yang diberikan. Pemanenan kalus berakar pada penelitian ini masih terlalu dini, kebanyakan pemanenan kultur untuk produksi alkaloid dilakukan setelah

kultur berumur lebih dari 30 hari dengan beberapa kali subkultur.

Alkaloid yang tidak terdeteksi menggunakan pereaksi Bourchardat dapat terjadi karena proses ekstraksi terlalu sederhana dan kandungan alkaloid dalam kalus berakar sangat rendah. Ekstraksi yang terlalu sederhana tidak dapat menghancurkan dinding sel dan tidak dapat memisahkan senyawa alkaloid dari dalam sel, karena alkaloid berada dalam bentuk terikat yang tidak dapat dibebaskan pada kondisi ekstraksi yang biasa (Robinson, 1995 dalam Aryati dkk., 2005). Pemilihan salah satu pereaksi dari pereaksi Bourchardat, Mayer, dan Dragendorff untuk uji kualitatif sudah sangat mewakili, namun untuk kadar alkaloid yang sangat rendah uji kualitatif dengan pereaksi Bourchardat ternyata masih kurang efektif. Uji kualitatif yang lebih efektif untuk kadar alkaloid yang sangat rendah dapat dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (TLC), HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*), GC-MS (*Gas Chromatograph-Mass Spectroscopy*), atau dengan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*).

KESIMPULAN

Peningkatan konsentrasi mikronutrien dalam medium MS (*Murashige and Skoog*) tanpa penambahan NAA menghambat pertumbuhan kalus berakar, namun belum dapat memicu pembentukan senyawa alkaloid yang ada didalamnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajungla, L., Patil, P. P., Barmukh, R. B., and Nikam, T. D. 2009. Influence of Biotic and Abiotic Elicitors on Accumulation of Hyoscyamine and Scopolamine in Root Cultures of *Datura metel* L. *Indian Journal of Biotechnology* 3(8): 317-322.
- Alexander, J. Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, JP., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernandez-Cruz, M. L., Furst, P., Fink-Gremmels, J., Galli, C. L., Grandjean, P., Gzyl, J., Heinemeyer, G., Johansson, N., Mutti, A., Schlatter, J., van Leeuwen, R., Peteghem, C. V., and Verger, P. 2008. Tropane Alkaloids (from *Datura* sp.) as Undesirable Substances in Animal Feed. *The European Food Safety Authority Journal* 691: 1-55.
- Aryati, H., Anggarwulan, E., dan Solichatun. 2005. Pengaruh Penambahan DL-Triptofan terhadap Pertumbuhan Kalus dan Produksi Alkaloid-Reserpin Pule Pandak (*Rauvolfia serpentina* (L.) Bentham ex Kurz.) secara *in vitro*. *Biofarmasi* 3(2): 52-56.
- Desender, S., Andrivon, D., and Val, F. 2007. Activation of Defense Reactions in Solanaceae: Where is The Specificity. *Cell Microbiol* 9:21-30.
- Devoto, A. and Turner, J. G. 2005. Jasmonate-Regulated Arabidopsis Stress Signalling Network. *Physiol Plantarum* 123:161-172.
- Husin, A., Soegihardjo, C. J., dan Wahyuono, S. 2002. Pengaruh Kombinasi Kadar Sukrosa dan Kalium Nitrat dalam Medium Murashige-Skoog (MS) Terhadap Kadar Atropina dan atau Hiosiamina pada Kultur Kalus *Datura stramonium* L. var. *stramonium*. Tesis. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Ivanchenko, M. G., Muday, G. K., and Dubrovsky, G. 2008. Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55: 335-347.
- Kidd, S. K., Melillo, A. A., Lu, R-H., Reed, D. G., Kuno, N., Uchida, K., Furuya, M., Jelesko, J. G. 2006. The A and B loci in Tobacco Regulate A Network of Stress Responses, Few of Which are Associated with Nicotine Synthesis. *Plant Mol Biol* 5 (60):699-716.
- Kusyati, S. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro, Semarang.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and van Breusegem, F. 2004. Reactive Oxygen Network of Plants. *Trends Plant Sci* 9:490-498.
- Palazon, J., Navarro-Ocana, A., Hernandez-Vazquez, L., and Mirjalili, M. H. 2008. Application of Metabolic Engineering to The Production

- of Scopolamine. *Molecules* 13: 1722-1742.
- Robbiani, D., Nurhidayati, T., dan Jadid, N. 2011. Pengaruh Kombinasi Naphtalene Acetic Acid (NAA) dan Kinetin pada Kultur *In vitro* Eksplan Daun Tembakau. *Skripsi*. Prodi Biologi Fakultas MIPA Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Roy, B. and Mandal, A. B. 2005. Towards Development of Al-toxicity Tolerant Lines in Indica Rice by Exploiting Somaclonal Variation. *Euphytica* 145(3): 221-227 (Abstract).